

BEST AVAILABLE COPY

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-185665
 (43)Date of publication of application : 03.07.2003

(51)Int.Cl.

G01N 33/53
 G01L 1/00
 G01N 13/20
 G01N 33/566
 G01N 37/00

(21)Application number : 2002-308525

(71)Applicant : SAMSUNG ELECTRONICS CO LTD

(22)Date of filing : 23.10.2002

(72)Inventor : CHO YOON-KYOUNG
 KIN SENKI
 OH KWANG-WOOK
 LIM GEUN-BAE
 IN TAISEI

(30)Priority

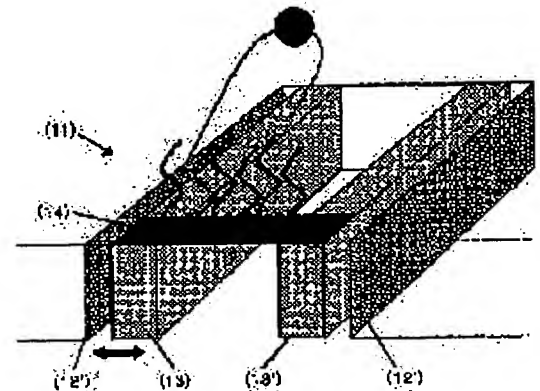
Priority number : 2001 200165484 Priority date : 23.10.2001 Priority country : KR

(54) BONDING DETECTION METHOD BETWEEN COMPLEMENTARY MOLECULES AND SHEAR STRESS MEASUREMENT SENSOR UTILIZED FOR THE METHOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for accurately detecting the bonding between a probe and a target.

SOLUTION: A shear stress on the surface of a sensor substrate (14) before and after the reaction of a probe to a target is measured, and the bonding between the probe and target is detected according to difference in the shear stress.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

23.10.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application]

JP,2005-183005,A [CLAIMS]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] (a) Phase of making a probe adhering to the front face of a sensor substrate (b) The front face of said sensor substrate, and the phase which supplies the sample which contains a target in the sample substrate which counters parallel, (c) The phase of adjusting spacing of said sensor substrate and said sample substrate according to the magnitude of said probe target complex, (d) Phase of making the probe adhering to said sensor substrate reacting with the target contained in said sample (e) The joint detection approach between complementary molecules including the phase which measures change of the shearing stress of the front face of said sensor substrate before and behind said reaction.

[Claim 2] Change of said shearing stress is the joint detection approach between the complementary molecules according to claim 1 characterized by obtaining by measuring the phase change of vibrational motion, and force change.

[Claim 3] Spacing of said sensor substrate and said sample substrate is the joint detection approach between the complementary molecules according to claim 1 characterized by being determined by measuring change of the repulsive force between said sensor substrate when narrowing the spacing concerned, and said sample substrate, and being adjusted according to the magnitude of probe target complex.

[Claim 4] Said probe is the joint detection approach between the complementary molecules according to claim 1 characterized by being a nucleic acid, protein, cofactor, oligosaccharide, or a cell.

[Claim 5] (a) With the signal input part which generates vibration (b) With the signal output part delayed in the vibration from said signal input part (c) The sensor substrate which connects said signal input part and said signal output part, (d) The front face of said sensor substrate, and sample substrate which counters parallel (e) The spacing controller which adjusts spacing of said sensor substrate and said sample substrate, (f) Shearing stress measurement sensor characterized by including the signal detecting element which measures the phase change of the vibrational motion between said signal input parts and said signal output parts, and force change.

[Claim 6] The vibrational motion between said signal input parts and said signal output parts is a shearing stress measurement sensor according to claim 5 characterized by being induced by the piezo-electric effect (electrical potential difference), electrostatic induction (capacity), electromagnetic induction (current), or the thermal-expansion phenomenon (volume).

[Claim 7] The sensor substrate which connects said signal input part, said signal output part, and these is a shearing stress measurement sensor according to claim 5 characterized by carrying out two or more unit array of these as one unit.

[Claim 8] Said spacing controller is a shearing stress measurement sensor according to claim 5 characterized by including the electrostatic-capacity measuring device which measures the electrostatic capacity between said sensor substrates and said sample substrates.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the approach and sensor which are applied to the shearing stress measurement sensor used for the joint detection approach between complementary molecules, and its approach, especially detect association with a probe and a target in a biochip.

[0002]

[Description of the Prior Art] A gene expression pattern, a defect, the distribution of protein, the reaction pattern, etc. which a biochip is a chip to which probes which it is going to analyze, such as DNA and protein, were made to adhere in high density on a substrate, and is a target in a sample can be analyzed. A biochip is divided into the microarray chip made to adhere on a solid-state substrate, and the lab-on-a-chip (lab-on-a-chip) made to adhere on a detailed channel by the adhesion gestalt of a probe. Moreover, it is divided into a DNA chip or a protein chip by the class of probe. In order to judge whether a probe and a combinable target exist in a sample, the system which can detect association with the probe and target which were fixed on the substrate is required of such a biochip.

[0003] After carrying out label attachment of the fluorescent material by the DNA chip for gene analysis at Sample DNA and making it react with the probe on a chip as an approach of detecting association with a probe and a target, there is a method of detecting the fluorescent material which remained in the chip front face using the confocal microscope or the CCD camera (for example, patent reference 1 reference.). However, the inverter with which such an optical detection approach digitizes an electrical signal since the output by which the miniaturization of a system was difficult and it was digitized directly is not obtained is needed.

[0004] Moreover, there is a method of detecting mixture-ization (hybridization) of DNA electrochemically, using metallic compounds with easy oxidation/reduction as other approaches (for example, the patent reference 2, 3 reference.). This approach detects this electrochemically paying attention to both other compounds with which oxidation/reduction contains an easy metal constituting a complex, when DNA is mixture-ized (for example, one to nonpatent literature 4 reference.). However, separate label attachment is required also for this electrochemical approach.

[0005] In addition, the research on the approach of detecting association with a probe and a target, without using a following fluorescent material and any of other following labels is advancing actively. How to measure the mass difference before and behind association using Xtal micro balance (Crystal Microbalance) to one of them for example, nonpatent literature 5 reference -- in addition -- being alike -- the approach (for example, nonpatent literature 6 and patent reference 4 reference --) of analyzing using a matrix auxiliary laser adion-ized (MALDI) mass-spectrometry method It is and there is also the approach of measuring the bonding strength between the molecules before and behind association with a DNA probe and a target to 1 base difference using the cantilever of the mechanical sensor type by which detailed assembly was carried out in others further (for example, nonpatent literature 7, 8 reference.). However, in this case, in order to have to measure refraction of a cantilever beam to a precision very much, expensive separate equipment of laser etc. is needed.

[0006] Therefore, conventionally, separate label attachment is unnecessary, and can obtain directly by making a detection result into an electric signal, and development of the new joint detection approach of a sensitive and efficient probe with expensive separate unnecessary equipment like laser is called for.

[0007]

[Patent reference 1] U.S. Pat. No. 6,141,096 specification [the patent reference 2] U.S. Pat. No. 6,096,273 specification [the patent reference 3] U.S. Pat. No. 6,090,933 specification [the patent reference 4] U.S. Pat.

No. 6,043,031 specification [nonpatent literature 1] Anal.Chem, Vol.70, pp.4670-4677, 1998[nonpatent literature 2] J. Am.Chem.Soc, Vol.119, pp.9861-9870, 1997[nonpatent literature 3] Analytica Chimica Acta, Vol.286, pp.219-224, 1994[nonpatent literature 4] Bioconjugate Chem, Vol.8, pp.906-913, 1997[nonpatent literature 5] Anal.Chem, Vol.70, pp.1288-1296, 1998[nonpatent literature 6] Anal.Chem, Vol.69, pp.4540-4546, 1997[nonpatent literature 7] Science, Vol.288, pp.316-318, 2000[nonpatent literature 8] Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 98, 1560, 2001 [0008]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Therefore, separate label attachment like a fluorescent material of the purpose of this invention is unnecessary, and it is offering the joint detection approach of a new probe and a target acquired considering a detection result as an electric signal.

[0009] Moreover, other purposes of this invention are offering the new shearing stress measurement sensor which can be used for the joint detection approach of a probe and a target.

[0010]

[Means for Solving the Problem] It is this invention in order to attain the purpose of this invention (a). The phase of making a probe adhering to the front face of a sensor substrate, (b) The front face of said sensor substrate, and the phase which supplies the sample which contains a target in the sample substrate which counters parallel, (c) The phase of adjusting spacing of said sensor substrate and said sample substrate according to the magnitude of said probe target complex, (d) Phase of making the probe adhering to said sensor substrate reacting with the target contained in said sample (e) The joint detection approach between complementary molecules including the phase which measures change of the shearing stress of the front face of said sensor substrate before and behind said reaction is offered.

[0011] In the approach of this invention, although measurement of shearing stress can use any well-known shearing stress measuring methods, it is using the approach of measuring the phase change of vibrational motion, and force change by the approach of this invention.

[0012] In the approach of this invention, the approach of measuring shearing stress is already learned well (J. Van Alsten, and S.Granick, Rev.Sci.Inst, 62, 463, 1991). If this approach is summarized, a signal input part will be vibrated with a sign curve, and the phase change of vibrational motion and force change will be measured in a signal output part. These change is greatly influenced according to viscosity, structure, etc. of the matter which are being fixed to the sensor front face. When the matter is an elastic solid, shearing stress is proportional to a strain by Hooke's law, and when it is a liquid, shearing stress is proportional to the rate of shearing with the principle of Newton. However, when it is a viscoelasticity liquid, they are collectively applied by two principles. An elastic shear multiplier is the elastic component of shearing stress, and is the component of deformation and an inphase. On the other hand, a viscous shear multiplier is the viscous component of shearing stress, and is a component proportional to the rate of shearing, i.e., the reduction of area of a film.

[0013] Since partial viscosity is expressed with the function of the distance in a front face, it cannot determine viscosity easily. However, since the viscous component of said shearing stress shows the effective viscosity in the semantics of giving resistance to a flow, it is used, defining it as viscous stress / rate of effective shearing. Here, the rates of effective shearing are the maximum shear amplitude / film thickness.

[0014] In the approach of this invention, although spacing of a sensor substrate and a sample substrate can be adjusted according to the magnitude of the probe target complex expected, it adjusts in the magnitude of the probe target complex determined by measuring change of the repulsive force of the sensor substrate which adhered spacing to the probe with slight straitness desirably.

[0015] In the approach of this invention, although a probe or a target can use any combinable probes alternatively, a desirable DNA oligomer and a desirable nucleic acid like c-DNA, an antigen, protein like an antibody, cofactor, oligosaccharide, a cell, etc. are included.

[0016] In order to attain other purposes of this invention, this invention (a) With the signal input part which generates vibration (b) With the signal output part delayed in the vibration from said signal input part (c) The sensor substrate which connects said signal input part and said signal output part, (d) The front face of said sensor substrate, and sample substrate which counters parallel (e) The spacing controller which adjusts spacing of said sensor substrate and said sample substrate, (f) The shearing stress measurement sensor containing the signal detecting element which measures the phase change of the vibrational motion between said signal input parts and said signal output parts and force change is offered.

[0017] It sets in the sensor of this invention and the signal input part/signal output part which inputs / outputs vibration (signal) move by periodic vibration, and if it is a measurable mechanism, any mechanisms can use extent of vibration. As for vibrational motion, it is desirable to be induced by the piezo-electric effect (electrical potential difference), electrostatic induction (capacity), electromagnetic induction (current),

or the thermal-expansion phenomenon (volume).

[0018] In the shearing stress measurement sensor of this invention, it is desirable to have the gestalt of the sensor by which the a large number array is carried out by the sensor substrate which connects a signal input part, a signal output part, and these becoming one unit. Such a sensor is efficiently used for the biochip made to fix by high density, and deals in many probes.

[0019] In the shearing stress measurement sensor of this invention, although the spacing controller which adjusts spacing of the front face of said sensor substrate, it, and the sample substrate that counters parallel can be used with any mechanical contrivance if spacing of a sensor substrate and a sample substrate can be adjusted, it is desirable to measure spacing of a sensor substrate and a sample substrate using electrostatic capacity. Since this spacing controller changes shearing stress with spacing between said substrate both sides, it is most important for it to measure shearing stress according to the magnitude of probe target complex.

[0020] Although any equipments can be used if it sets in the sensor of this invention and a signal detecting element can measure the phase change of vibrational motion and force change between a signal input part and a signal output part, a lock-in amplifier is desirably used for the equipment and the pan which measure an elastic shear multiplier and a viscous shear multiplier.

[0021]

[Embodiment of the Invention] Hereafter, this invention is explained to a detail based on the attached drawing.

[0022] Drawing 1 is drawing with which explanation of 1 desirable operation gestalt of this invention is presented, and shows the mimetic diagram of the sensor which measures shearing stress using the diaphragm of a piezo-electric type. The shearing stress measurement sensor 1 is constituted as follows. the support substrate 2 -- a diaphragm 3 and 3' -- it is confronted each other and attached, and the sensor substrate 4 is attached in the edge of the diaphragm 3 and 3' so that the field may become parallel to the support substrate 2. The sensor substrate 4 is attached to the support substrate 2 two or more picking, as shown in drawing. A diaphragm 3 is used as a signal input part, and, as for diaphragm 3' of another side, while supporting the sensor substrate 4 is used as a signal output part. Said diaphragm 3 and 3' (for example, piezo-electric bimorph) vibrate according to the piezo-electric effect, and the phase change of the vibrational motion and force change are detected by the signal detecting element 5. The front face of the sensor substrate 4 adheres to probes, such as DNA alternatively combined with a target, or a protein. The sensor substrate 4 and the sample substrate 6 are arranged face to face so that the front face of both substrates may become parallel, can make the attitude migration of the support substrate 2 or the sample substrate 6 able to carry out perpendicularly with mechanical contrivance (not shown), can adjust spacing of the sensor substrate 4 and the sample substrate 6, and can measure this spacing using the electric capacity measuring device 7.

[0023] Drawing 2 is the mimetic diagram (drawing 2 A) showing how to adhere the probe which is different from each other in the shearing stress measurement sensor concerning this invention, and the mimetic diagram (drawing 2 B) showing a mixture-ized reaction with the sample which it is going to analyze. First, it dips in the multi-well container 9 into which the probe 8 of the class which is different from each other in the shearing stress measurement sensor 1 by which the diaphragm was attached was put, and a probe is made to adhere. Next, a sensor 1 is dipped in the single well container 10 into which the target was put, and a mixture-ized reaction is made to cause. In addition, the sample substrate 6 is located in the pars basilaris ossis occipitalis of said single well container 10. Next, after passing through a washing phase, shearing stress measurement is performed within the container currently put into the buffer solution.

[0024] Drawing 3 is the mimetic diagram showing having arranged two or more sensors of drawing 1 . Here, one pair of rods which appear face to face show one sensor component which consisted of substrates which connect a signal input part, a signal output part, and these.

[0025] Drawing 4 is drawing with which explanation of 1 desirable operation gestalt of this invention is presented, and is the mimetic diagram of the sensor which measures shearing stress using the diaphragm of an electrostatic type. here -- shearing stress -- measurement -- a sensor -- 11 -- two -- a ** -- a diaphragm -- 13 -- 13 -- ' -- each -- a diaphragm -- having adjoined -- immobilization -- a field -- 12 -- 12 -- ' -- said -- a diaphragm -- both ends -- a part -- connecting -- a sensor -- a substrate -- 14 -- containing . Among this diaphragm 13 and 13', one diaphragm 13 is used as a signal input part, and diaphragm 13' of another side is used as a signal output part. At drawing 4 , the diaphragm 13 of the shearing stress measurement sensor 11 and 13' are not piezo-electric types as shown in drawing 1 , and vibrate according to electrostatic force, and this vibration is detected by the signal detecting element (not shown) by measuring the field 12 currently

fixed horizontally and an electrostatic-capacity difference with 12'.

[0026]

[Example] Hereafter, this invention is further explained to a detail through an example. These examples are not illustrated in order to only make an understanding of this invention easy, and the range of this invention is not restricted by these examples.

[0027] [Example 1]

In order to test whether the fixed book experiment of a DNA oligomer probe which carried out thiol deformation can measure the change before and behind a mixture-ized reaction according to a shearing stress difference, the surface force equipment (surface forces apparatus; SFA) changed so that shearing-force measurement could be performed was used (S. Science Granick, 1991, 253, 1374 reference). According to the general SFA experiment approach, the muscovite was formed in the shape of [without a level difference / smooth] a sheet (a mica sheet is called hereafter), sputtering of 660A Ag was carried out to the one side, Ag side was formed, and radius of curvature R pasted up the mica sheet on the lens 2cm or less with adhesives.

[0028] Since DNA was fixed to Ag side of a mica sheet, DNA which carried out thiol deformation was used. The distance between two mica sheet front faces was measured using the multiplex beam interference measuring method according to the known approach (J. Phys. Chem. B. Journal of Colloid and Interface Science, 1973, 44, 2, 259 and 1973, 2000, 104, 7652 reference). In a general SFA experiment, it experiments in the mica sheet front face of the upper and lower sides by which Ag sputtering was carried out to the liquid which turns Ag layer front face outside and is between mica front faces. In this experiment, in order to use the combined DNA probe film, it has arranged so that, as for one side, a mica front face may counter Ag layer and another side may counter mutually.

[0029] Although it jumped by flat contact according to strong Van der Waals force when spacing on Ag layer front face and the front face of a mica became 300A, this means that the front face of a mica and Ag layer is very clean. When two or more places of the point of contact of Ag layer and a mica were measured, the wavelength of structural active jamming was fixed within and without 2-4A. The granularity of Ag layer front face was able to measure double-sided relative spacing comparatively correctly, although the inside and outside of 15-20Arms were presumed. The refractive index of a DNA solution required at the time of thickness calculation was assumed to be 1.46 (Jordan, Frutos, Thiel, 4939 reference [Corn, / C.E.; A.G.; A.T.; R.M. Anal. Chem. / 1997, 69,]).

[0030] The oligonucleotide of some following array numbers 1 of the Iduronate-2-sulphate (IDS) exon gene considered to be the cause of a hunter syndrome disease was used for the probe.

[0031] Array number: 1 (SH-C6-5' - GTT CTT CTC ATC ATC-3')

[0032] It is Research about this oligomer. It purchased by Genetics (Huntsville, AL) and the five prime end was made to transform with an alkane thiol spacer. Molecular weight was $M=4651$ g/mol. ss-DNA which carried out thiol denaturation After contacting Ag layer front face in 1mM solution (1MN aH₂ PO₄, pH4.0) and making it stick to it for 3 hours, sequential washing was carried out by the buffer solution and deionized water, and it dried by N₂ gas. Removed DNA to which it stuck physically, in order to make that of ss-DNA probe into the structure prolonged from the front face, 1mM mercapto hexanol and (HS-(CH₂)₆OH) were made to contact for 10 minutes, and subsequently it washed by deionized water, and dried by N₂ gas.

[0033] [Example 2]

In order to conduct the mixture-ized mixture-ized reaction experiment of a probe and complementary rank The following array number 2 () complementary to a probe [3'-CAA] 1.5 mM ss-DNA solution which has GAA TAG-5' GAG (it is made to react for 2 hours at TE-1M NaCl buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1M NaCl pH7.6) and 38 degrees C subsequently) TAG 38 degrees C TE-1M It washed one by one by the NaCl buffer and deionized water, and was made to dry by N₂ gas.

[0034] Array number: 2 (3' - CAA GAA GAG TAG TAG-5')

[0035] [Example 3]

Measurement of the measurement repulsive force of repulsive force was measured using the changed surface force equipment (Modified Surface Forces Apparatus, S. Granick, Science, 253, 1374 and 1991, J. Peachey, J. VanAlsten, and S. Granick, Rev. Sci. Inst, 62 and 463, 1991 reference) which used the principle of the sensor shown in drawing 1 . After making the oligomer which carried out thiol denaturation stick to Ag layer front face, the repulsive force of the DNA thin film before and behind a mixture-ized reaction was measured.

[0036] It is NaCl between immobilization of ss-DNA probe, or the front face after a mixture-ized reaction. It experimented by dropping one drop of 1M solution. Under the present circumstances, the inferior surface of

tongue became a pure mica, and the top face turned into a front face which turned into a field to which DNA by which Ag layer surface thiol denaturation was carried out was made to fix, or was mixture-ized by this field with the target.

[0037] DNA did not stick to the mica of not processing [by which it is electrified underwater], in the control experiment. Therefore, it has the configuration (end-tethered) by which the amount of [of oligomer] end adhered in the DNA oligomer by which thiol denaturation was carried out, and end constraint was carried out, and the mica front face of the opposite side has little nonspecific adsorption.

[0038] When spacing between both sides is separated 1mm or more, a micropipette is used, and it is NaCl1M. One drop of solution was dropped, and double-sided spacing was measured using the multiplex beam interference measuring method, having applied the fixed force to the spring with which the lower mica front face is being fixed, and narrowing double-sided spacing gradually. The given force and the distance which moves by the number of strings were compared with the distance which actually moved, and it asked for the force distance curve as shown in the above figure of drawing 5.

[0039] Drawing 5 is a graph which shows the data measured using the changed surface force equipment (S. Granick, Science, 253, 1374 and 1991, J.Peachey, J.VanAlsten, and S.Granick, Rev.Sci.Inst, 62 and 463, 1991 reference) which used the principle of the sensor shown in drawing 1. Here, combined with Ag layer front face the lobe which carried out thiol denaturation, and it was made to adsorb by the monolayer approach, and asked for the repulsive force (above figure) and shearing stress (the following figure) of a DNA thin film before and behind a complementary base pair and a mixture-ized reaction. Square (**):1.0M ss-DNA; triangle [in a NaCl solution] (**): -- 1.0M after the ss-DNA; circular (-):mixture-ized reaction in 1.0MNaCl solution after mercapto hexanol addition of an excess amount ds-DNA in a NaCl solution. the elastic shearing-force constant g which shows spacing between a Y-axis and both sides for the repulsive force (F/R) standardized with radius of curvature R in the above figure by the X-axis, sets a left-hand side Y-axis as shearing stress, i.e., elastic shear multiplier, G' at the following figure, and has not been standardized with an effective interfacial area -- ' -- a right-hand side Y-axis -- carrying out -- spacing between both sides -- the X-axis -- carrying out -- half--- a logarithm -- the scale showed. The ratio of the shearing stress G' :perpendicular pressure P_N was shown in drawing 5. In addition, shearing stress was measured by 1.3Hz and the effective interfacial area was calculated using the langue BAIN approximate expression ($A_{eff} - 2\pi R D$).

[0040] ss-DNA used for reference at the experiment The die length of 77A and ds-DNA is predicted to be 63A for the die length of 15mer. ss-DNA probe which has the thiol end before processing by the mercapto hexanol as the square notation showed to the above figure of drawing 5 is 1.0M. When contained in a NaCl solution, repulsive force began from about $43^{**}2A$, and has measured the $****$ thickness which is not compressed any more in $26^{**}2A$.

[0041] The $****$ thickness which it becomes the structure to which the DNA probe extended more, and the thickness from which repulsive force begins begins from about $80^{**}2A$ thicker than the case where only ss-DNA probe exists, on it, and is not compressed any more on it when it processes by the mercapto hexanol on the front face to which ss-probe was made to stick (triangle) was $28^{**}2A$.

[0042] Repulsive force began from about $72^{**}2A$ after the mixture-ized reaction, it increased to $41^{**}2A$ in monotone, and it jumped to $30^{**}2A$ suddenly by $41^{**}2A$. Comparatively hard ds-DNA cannot bear this at a too heavy perpendicular pressure, but it is thought that the tilt angle was changed. Therefore, the magnitude of ds-DNA does not have $41^{**}2A$, and is about $31^{**}2A$ desirably $30^{**}2A$.

[0043] If repulsive force is measured bringing other front faces close to the front face on which the DNA probe was fixed so that the above result may show, the generating existence of a mixture-ized reaction understands at least the difference of the force. That is, even if it measures only repulsive force correctly, the thickness of a single and a duplex muscle and the difference of the force can be checked. However, it is hard to measure repulsive force correctly, and the demerit in which the difference of a single and a duplex muscle is small compared with shearing stress has it.

[0044] [Example 4]

Measurement of shearing stress, next the example which detects a DNA mixture-ized reaction using shearing stress are explained. Using the shearing stress measuring device shown in the mimetic diagram of drawing 1, change of the shearing stress of DNA is measured and the existence of the mixture-ized reaction of DNA is detected. At the time of an experiment, the shear amplitude was made smaller than $2A$, and it experimented in it in the linearity format which does not block a system as much as possible.

[0045] Movement of diaphragm 3' of the opposite side which performs sign curvilinear mold excitation on various frequencies, and functions the diaphragm 3 which functions as a signal input part as a signal output

part was detected, elasticity and a viscous response were distinguished, the elastic force or viscous force of a sample was measured, and the elastic force in it was shown in the following figure of drawing 5. It turns out that the elastic force after a mixture-ized reaction is notably larger than viscous force. Since the reinforcement of mixture-ized DNA is far larger than ss-DNA, this is considered.

[0046] Moreover, as the insertion Fig. of drawing 5 shows, shearing stress is understood that shearing stress is far large if it standardizes by the perpendicular pressure P_N as G' . Therefore, shearing stress is understood that sensibility is high in mixture-ized reaction detection from repulsive force.

[0047] The experiment of drawing 5 is the result of experimenting having carried out the shear frequency to the shear amplitude uniformly, and making gap thickness thin, and drawing 6 is data which were made to fix to $31 \times 2A$ of the dyad magnitude level which obtained spacing between both sides from the experimental result of drawing 5, gave shearing of various frequencies to ss-DNA and a ds-DNA film, and compared the elastic shear multiplier (above figure) with the viscous shear multiplier (the following figure). Here, the data notation is the same as that of drawing 5. left-hand side -- a Y-axis -- effective -- elasticity -- shear -- a multiplier -- G' -- ' (above figure) -- effective -- viscosity -- shear -- a multiplier -- G'' -- " (the following figure) -- langue -- BAIN -- an approximate expression -- using it -- having standardized -- the force -- it is - - right-hand side -- a Y-axis -- an effective interfacial area -- standardizing -- **** -- elasticity (above figure) -- and -- viscosity (the following figure) -- shearing force -- a constant -- g' -- ' -- g'' -- " -- it is -- the X-axis -- a radian shear frequency -- it is . As illustrated, it turns out that the elasticity and coefficient of viscosity of order of a sample after a mixture-ized reaction are larger than ss-DNA before a mixture-ized reaction, and the existence of the mixture-ized reaction of DNA can be detected using this.

[0048] When spacing of the sensor substrate 4 and the sample substrate 6 is $31 \times 2A$ and drawing 7 spreads the shear amplitude of ss-DNA and a ds-DNA film, it is a graph which shows the measured elastic shear multiplier (black omission notation) and a viscous shear multiplier (void notation). a data notation -- square (**, **): -- 1.0M ss-DNA; triangle (**, **): in a NaCl solution -- 1.0M after mercapto hexanol addition of an excess amount ss-DNA; circular (-, O): in a NaCl solution -- 1.0M after a mixture-ized reaction It is ds-DNA in a NaCl solution, and the standardization approach is the same as that of drawing 6. If the shear amplitude is spread, a multiplier will decrease with a certain marginal shear amplitude. However, even if the shear amplitude was set to about 10nm and the sample was in nonlinear conditions, the difference of the shear multiplier after ss-DNA probe and a mixture-ized reaction was 10 or more times.

[0049] Although experimented above using the target sample in which the array carried out full coincidence, even if it uses a sample with mutation, such as single base mutation, it is expected with ss-probe that it is practically equal.

[0050]

[Effect of the Invention] By measuring the shearing stress difference on the front face of a sensor before and after the probe on the front face of a sensor combines with a target, when analyzing quality of a living thing, such as DNA or a protein, according to the detection approach of this invention, as mentioned above Compared with the approach of unlike the detection approach using the existing fluorescent material, separate label attachment being unnecessary, and detecting by the electric signal, and measuring refraction extent of a cantilever, it is still more sensitive, and expensive equipment like laser becomes unnecessary.

[Translation done.]

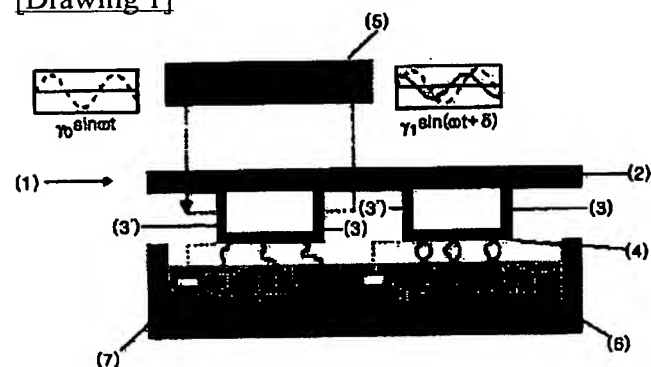
* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

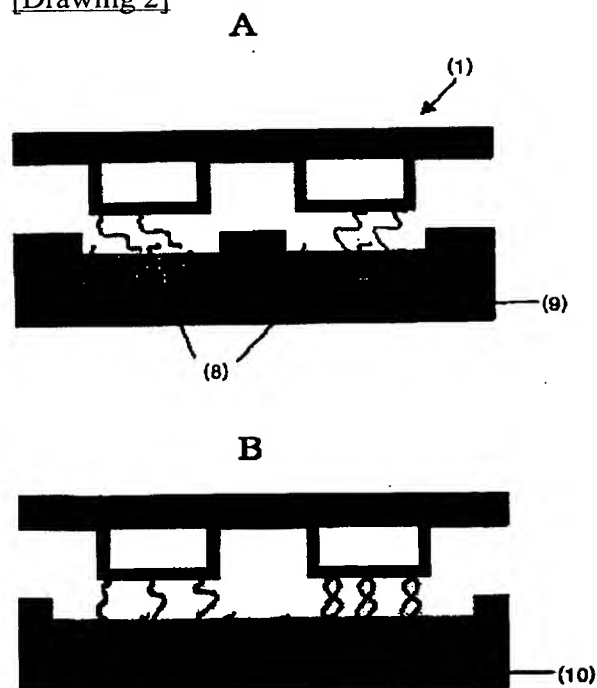
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

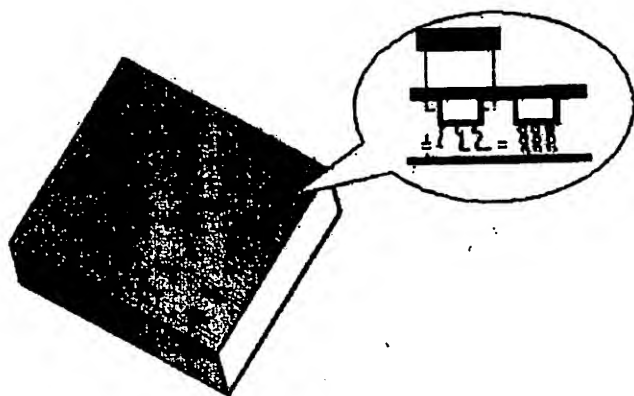
[Drawing 1]



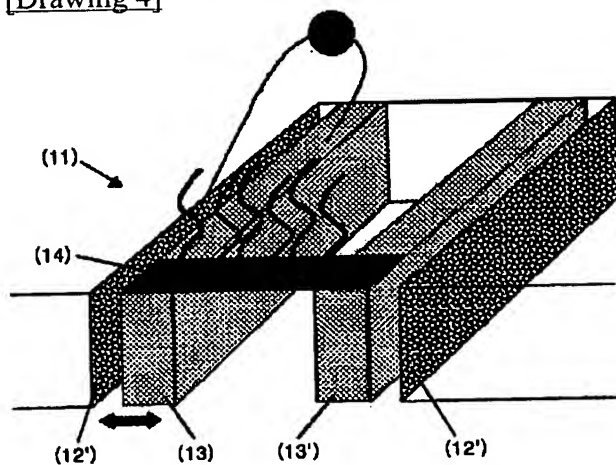
[Drawing 2]



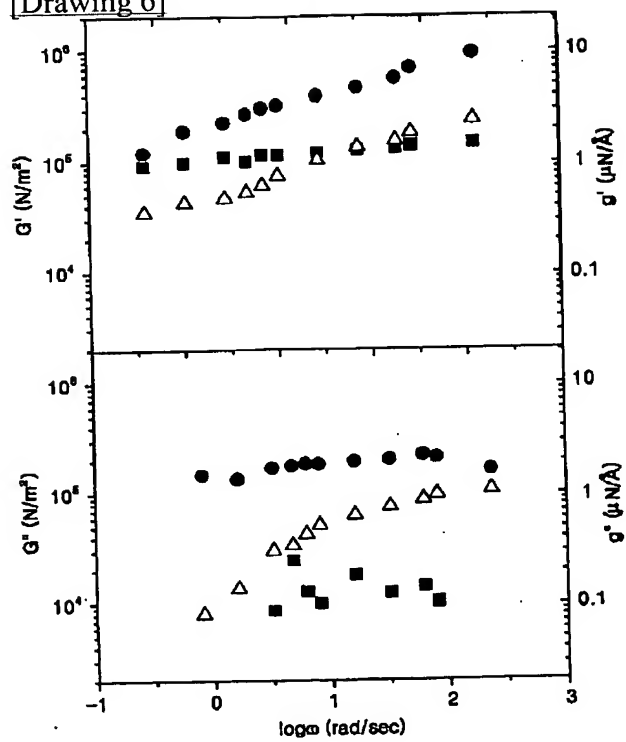
[Drawing 3]



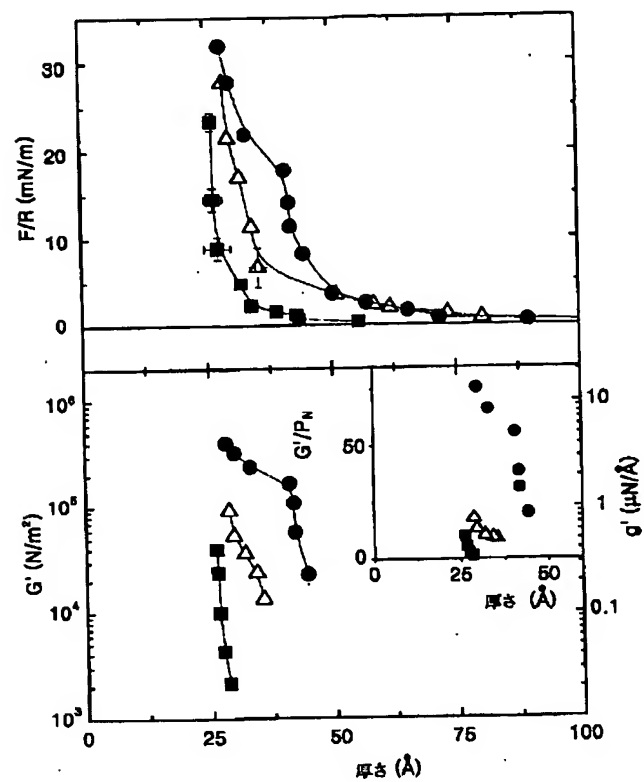
[Drawing 4]



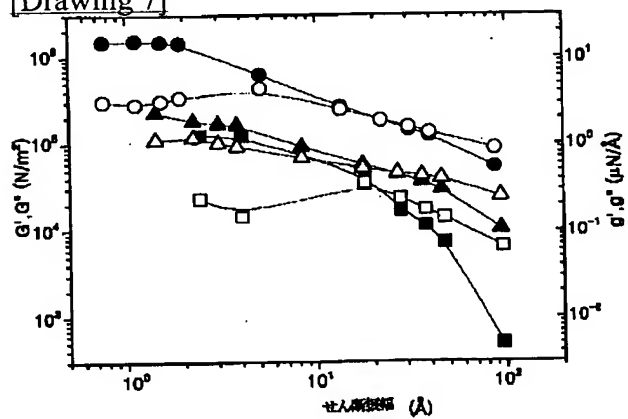
[Drawing 6]



[Drawing 5]



[Drawing 7]



[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-185665
(P2003-185665A)

(43) 公開日 平成15年7月3日(2003.7.3)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	マークシート(参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 L 1/00		G 0 1 L 1/00	L
G 0 1 N 13/20		G 0 1 N 13/20	A
33/566		33/566	
37/00	1 0 2	37/00	1 0 2
審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 9 頁)			

(21) 出願番号 特願2002-308525(P2002-308525)

(22) 出願日 平成14年10月23日(2002.10.23)

(31) 優先権主張番号 2 0 0 1 - 0 6 5 4 8 4

(32) 優先日 平成13年10月23日(2001.10.23)

(33) 優先権主張国 韓国 (K R)

(71) 出願人 390019839

三星電子株式会社

大韓民国京畿道水原市八達区梅灘洞416

(72) 発明者 趙 允 ▲けい▼

大韓民国京畿道水原市八達区豊通洞1053-

2番地 風谷マウル信明アパート203棟

1605号

(72) 発明者 金 宣 希

大韓民国京畿道水原市八達区豊通洞955-

1番地 風谷住公アパート102棟304号

(74) 代理人 100072349

弁理士 八田 幹雄 (外4名)

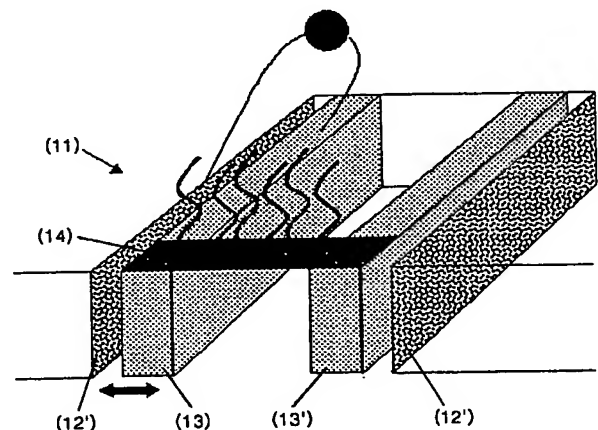
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 相補分子間の結合検出方法およびその方法に利用されるせん断応力測定センサー

(57) 【要約】

【課題】 プローブとターゲットとの結合を高精度に検出できる方法を提供する。

【解決手段】 プローブとターゲットとの反応前後のセンサー基板(14)表面のせん断応力を測定し、そのせん断応力の差によって、プローブとターゲットとの結合を検出する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) センサー基板の表面にプローブを付着させる段階と、(b) 前記センサー基板の表面と平行に対向する試料基板にターゲットを含む試料を投入する段階と、(c) 前記センサー基板と前記試料基板との間隔を前記プローブターゲット複合体の大きさに合わせて調節する段階と、(d) 前記センサー基板に付着しているプローブを前記試料に含まれるターゲットと反応させる段階と、(e) 前記反応前後における前記センサー基板の表面のせん断応力の変化を測定する段階とを含む相補分子間の結合検出方法。

【請求項2】 前記せん断応力の変化は、振動運動の相変化と力変化を測定することによって得ることを特徴とする請求項1に記載の相補分子間の結合検出方法。

【請求項3】 前記センサー基板と前記試料基板との間隔は、当該間隔を狭めたときの前記センサー基板と前記試料基板との間の反発力の変化を測定することによって決定され、プローブターゲット複合体の大きさに合わせて調節されることを特徴とする請求項1に記載の相補分子間の結合検出方法。

【請求項4】 前記プローブは、核酸、蛋白質、補助因子、オリゴ糖類または細胞であることを特徴とする請求項1に記載の相補分子間の結合検出方法。

【請求項5】 (a) 振動を発生する信号入力部と、(b) 前記信号入力部からの振動を遅延する信号出力部と、(c) 前記信号入力部と前記信号出力部とを接続するセンサー基板と、(d) 前記センサー基板の表面と平行に対向する試料基板と、(e) 前記センサー基板と前記試料基板との間隔を調節する間隔調節部と、(f) 前記信号入力部と前記信号出力部との間の振動運動の相変化と力変化とを測定する信号検出部とを含むことを特徴とするせん断応力測定センサー。

【請求項6】 前記信号入力部と前記信号出力部との間の振動運動は、圧電効果(電圧)、静電誘導(容量)、電磁誘導(電流)または熱膨張現象(体積)により誘発されることを特徴とする請求項5に記載のせん断応力測定センサー。

【請求項7】 前記信号入力部、前記信号出力部及びこれらを接続するセンサー基板は、これらを一単位として複数単位配列されていることを特徴とする請求項5に記載のせん断応力測定センサー。

【請求項8】 前記間隔調節部は、前記センサー基板と前記試料基板との間の静電容量を測定する静電容量測定装置を含むことを特徴とする請求項5に記載のせん断応力測定センサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、相補分子間の結合検出方法およびその方法に利用されるせん断応力測定センサーに係り、特にバイオチップにおいてプローブとタ

ーゲットとの結合を検出する方法およびセンサーに関する。

【0002】

【従来の技術】バイオチップとは、分析しようとするDNA、蛋白質などのプローブを基板上に高密度で付着させたチップであって、試料内のターゲットである遺伝子の発現パターンや欠陥、蛋白質の分布や反応パターンなどを分析しうる。バイオチップは、プローブの付着形態によって、固体基板上に付着させたマイクロアレイチップと、微細チャンネル上に付着させたラブ・オン・チップ(lab-on-a-chip)とに分けられる。また、プローブの種類によって、DNAチップまたは蛋白質チップなどに分けられる。このようなバイオチップでは、試料内にプローブと結合可能なターゲットが存在するかどうかを判断するために、基板上に固定されたプローブとターゲットとの結合を検出できるシステムが必要である。

【0003】プローブとターゲットとの結合を検出する方法としては、遺伝子分析用のDNAチップで試料DNAに蛍光物質をラベル付けし、チップ上のプローブと反応させた後、共焦点顕微鏡やCCDカメラを使用してチップ表面に残った蛍光物質を検出する方法がある(例えば、特許文献1参照)。しかし、このような光学的な検出方法は、システムの小型化が難しく、直接デジタル化された出力が得られないために、電気信号をデジタル化する変換装置が必要になる。

【0004】また、他の方法としては、DNAの混成化(hybridization)を酸化/還元が容易な金属化合物を用いて電気化学的に検出する方法がある(例えば、特許文献2、3参照)。この方法は、DNAが混成化された時、酸化/還元が容易な金属を含む他の化合物が共に錯体を構成することに着目し、これを電気化学的に検出するものである(例えば、非特許文献1~4参照)。しかし、この電気化学的な方法も別途のラベル付けが必要である。

【0005】その他、以下のような、蛍光物質や他のいかなるラベルも使用せずにプローブとターゲットとの結合を検出する方法についての研究が活発に進行しつつある。そのうちの1つには、水晶マイクロバランス(Crystal Microbalance)を用いて結合前後の質量差を測定する方法(例えば、非特許文献5参照)、その他には、マトリックス補助レーザー吸着イオン化(MALDI)質量分光測定法を用いて分析する方法(例えば、非特許文献6、特許文献4参照)があり、さらに、その他には、DNAプローブとターゲットとの結合前後における分子間の結合力を微細組立された機械的センサータイプのカンチレバーを用いて1塩基差まで測定する方法もある(例えば、非特許文献7、8参照)。しかし、この場合には、カンチレバービームの屈折を非常に精密に測定しなければならないため、レー

ザーなどの別途の高価な装備が必要になる。

【0006】したがって、従来、別途のラベル付けが不要で、検出結果を電気的信号として直接得ることができ、レーザーのような別途の高価な装備が不要な、敏感で効率的なプローブの新たな結合検出方法の開発が求められている。

【0007】

【特許文献1】米国特許第6,141,096号明細書

【特許文献2】米国特許第6,096,273号明細書

【特許文献3】米国特許第6,090,933号明細書

【特許文献4】米国特許第6,043,031号明細書

【非特許文献1】Anal. Chem, Vol. 70, pp. 4670-4677, 1998

【非特許文献2】J. Am. Chem. Soc, Vol. 119, pp. 9861-9870, 1997

【非特許文献3】Analytica Chimica Acta, Vol. 286, pp. 219-224, 1994

【非特許文献4】Bioconjugate Chem, Vol. 8, pp. 906-913, 1997

【非特許文献5】Anal. Chem, Vol. 70, pp. 1288-1296, 1998

【非特許文献6】Anal. Chem, Vol. 69, pp. 4540-4546, 1997

【非特許文献7】Science, Vol. 288, p. 316-318, 2000

【非特許文献8】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 1560, 2001

【0008】

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明の目的は、蛍光物質のような別途のラベル付けが不要で、検出結果を電気的信号として得られる新たなプローブとターゲットの結合検出方法を提供することである。

【0009】また、本発明の他の目的は、プローブとターゲットの結合検出方法に利用できる新たなせん断応力測定センサーを提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明の目的を達成するために本発明は、(a) センサー基板の表面にプローブを付着させる段階と、(b) 前記センサー基板の表面と平行に対向する試料基板にターゲットを含む試料を投入する段階と、(c) 前記センサー基板と前記試料基板との間隔を前記プローブターゲット複合体の大きさに合わせて調節する段階と、(d) 前記センサー基板に付着しているプローブを前記試料に含まれるターゲットと反応させる段階と、(e) 前記反応前後における前記センサー基板の表面のせん断応力の変化を測定する段階とを含む相補分子間の結合検出方法を提供する。

【0011】本発明の方法において、せん断応力の測定は、公知のいかなるせん断応力測定方法も使用できる

が、本発明の方法では、振動運動の相変化と力変化を測定する方法を使用している。

【0012】本発明の方法において、せん断応力を測定する方法は、既によく知られている(J. Van Alsten, and S. Granick, Rev. Sci. Inst, 62, 463, 1991)。この方法を要約すれば、信号入力部をサイン曲線で振動させ、信号出力部で振動運動の相変化と力変化とを測定する。これらの変化はセンサー表面に固定されている物質の粘度や構造などにより大きく影響を受ける。物質が弾性固体である場合、せん断応力はフックの法則によってひずみに比例し、液体である場合、せん断応力はニュートンの法則によってせん断率に比例する。しかし、粘弾性液体である場合には2つの法則が併せて適用される。弾性せん断係数はせん断応力の弾性成分であって、変形と同相の成分である。一方、粘性せん断係数はせん断応力の粘性成分であって、せん断率、すなわちフィルムの変形率に比例する成分である。

【0013】局所粘度は表面における距離の関数で表されるため粘度を決めにくい。しかし、フローに抵抗を与えるという意味での有効粘度は前記せん断応力の粘性成分から分かるので、粘性応力/有効せん断率と定義して使用する。ここで、有効せん断率とは、最大せん断振幅/フィルム厚さである。

【0014】本発明の方法において、センサー基板と試料基板との間隔は予想されるプローブターゲット複合体の大きさに合わせて調節できるが、望ましくは間隔を狭めながらプローブが付着されたセンサー基板の反発力の変化を測定することによって決定されたプローブターゲット複合体の大きさに調節する。

【0015】本発明の方法において、プローブまたはターゲットは選択的に結合可能ないかなるプローブも使用できるが、望ましくはDNAオリゴマー、c-DNAのような核酸、抗原、抗体のような蛋白質、補助因子、オリゴ糖類及び細胞などを含む。

【0016】本発明の他の目的を達成するために、本発明は、(a) 振動を発生する信号入力部と、(b) 前記信号入力部からの振動を遅延する信号出力部と、

(c) 前記信号入力部と前記信号出力部とを接続するセンサー基板と、(d) 前記センサー基板の表面と平行に対向する試料基板と、(e) 前記センサー基板と前記試料基板との間隔を調節する間隔調節部と、(f) 前記信号入力部と前記信号出力部との間の振動運動の相変化と力変化とを測定する信号検出部とを含むせん断応力測定センサーを提供する。

【0017】本発明のセンサーにおいて、振動(信号)を入力/出力する信号入力部/信号出力部は周期的な振動で動かし、振動の程度を測定可能なメカニズムであれば、いかなるメカニズムも使用できる。振動運動は、圧電効果(電圧)、静電誘導(容量)、電磁誘導(電流)

または熱膨張現象（体積）により誘発されることが望ましい。

【0018】本発明のせん断応力測定センサーにおいては、信号入力部、信号出力部及びこれらを接続するセンサー基板が1つの単位となって多数配列されているセンサーの形態を有することが望ましい。このようなセンサーは多数のプローブを高密度で固定させるバイオチップに効率よく使用されうる。

【0019】本発明のせん断応力測定センサーにおいて、前記センサー基板の表面とそれと平行に対向する試料基板との間隔を調節する間隔調節部は、センサー基板と試料基板との間隔を調節できるものであればいかなる機械的装置でも使用できるが、静電容量を用いてセンサー基板と試料基板との間隔を測定することが望ましい。この間隔調節部は前記基板両面間の間隔によってせん断応力が変わるため、プローブターゲット複合体の大きさに合わせてせん断応力を測定することが最も重要である。

【0020】本発明のセンサーにおいて、信号検出部は信号入力部と信号出力部との間における振動運動の相変化と力変化とを測定できるものであれば、いかなる装置も利用できるが、望ましくは、弾性せん断係数及び粘性せん断係数を測定する装置、さらに望ましくはロックイン増幅器を使用する。

【0021】

【発明の実施の形態】以下、添付した図面にに基づき、本発明を詳細に説明する。

【0022】図1は、本発明の望ましい一実施形態の説明に供する図であって、圧電タイプの振動板を用いてせん断応力を測定するセンサーの模式図を示すものである。せん断応力測定センサー1は次のように構成される。支持基板2には振動板3、3' 対峙して取り付けられ、その振動板3、3' の端部には支持基板2に対してその面が平行になるように、センサー基板4が取り付けられる。センサー基板4は、図に示すように、支持基板2に複数取り付けられる。センサー基板4を支える一方の振動板3は信号入力部として使用され、他方の振動板3' は信号出力部として使用される。前記振動板3、3'（例えば圧電バイモルフ）は圧電効果により振動し、その振動運動の相変化と力変化とが信号検出部5により検出される。センサー基板4の表面にはターゲットに選択的に結合するDNAまたはプロテインなどのプローブが付着される。センサー基板4と試料基板6とは、両基板の表面が平行になるよう対向して配置されており、機械的装置（図示せず）により支持基板2または試料基板6を垂直方向に進退移動させてセンサー基板4と試料基板6との間隔を調節でき、この間隔は電気容量測定装置7を用いて測定することができる。

【0023】図2は、本発明に係るせん断応力測定センサーに相異なるプローブを付着する方法を示す模式図

（図2A）と、分析しようとする試料との混成化反応を示す模式図（図2B）である。まず、振動板が取り付けられたせん断応力測定センサー1を、相異なる種類のプローブ8を入れたマルチウェル容器9に浸しプローブを付着させる。次に、ターゲットを入れた単一ウェル容器10にセンサー1を浸して混成化反応を起こさせる。なお、試料基板6は前記単一ウェル容器10の底部に位置する。次に、洗浄段階を経た後、バッファ溶液が入れられている容器内でせん断応力測定を行う。

10 【0024】図3は、図1のセンサーを複数配列したことを示す模式図である。ここで、対向して見える1対の棒は信号入力部、信号出力部及びこれらを接続する基板より構成された1つのセンサー素子を示す。

【0025】図4は、本発明の望ましい一実施形態の説明に供する図であって、静電タイプの振動板を用いてせん断応力を測定するセンサーの模式図である。ここで、せん断応力測定センサー11は2つの振動板13、13'、それぞれの振動板に隣接した固定面12、12' と、前記振動板の両末端部分を連結するセンサー基板14を含む。この振動板13、13' の内、一方の振動板13は信号入力部として使用され、他方の振動板13' は信号出力部として使用される。図4では、せん断応力測定センサー11の振動板13、13' は、図1に示したような圧電タイプではなく静電力によって振動するものであり、この振動は、横に固定されている面12、12' との静電容量差を測定することによって信号検出部（図示せず）で検出する。

【0026】

30 【実施例】以下、実施例を通じて本発明をさらに詳細に説明する。これら実施例は単に本発明の理解を容易にするために例示するものであり、本発明の範囲はこれらの実施例により制限されるものではない。

【0027】【実施例1】

チオール変形したDNAオリゴマープローブの固定
本実験は、せん断応力差によって混成化反応前後の変化が測定できるか否かをテストするために、せん断力測定ができるように改変した表面力装置（surface forces apparatus; SFA）を使用した（Granick, S. Science 1991, 253, 1374参照）。一般のSFA実験方法にしたがい、白雲母を段差のない平滑なシート状に形成し（以下、雲母シートと称する）、その片面に660 ÅのAgをスパッタリングしてAg面を形成し、その雲母シートを曲率半径Rが2 cm以下のレンズに接着剤で接着した。

40 【0028】雲母シートのAg面にDNAを固定するためチオール変形したDNAを使用した。2つの雲母シート表面間の距離は既知の方法にしたがい多重ビーム干渉測定方法を用いて測定した（Journal of Colloid and Interface Scie

nce, 1973, 44, 2, 259, 1973, J. Phys. Chem. B. 2000, 104, 7652 参照)。一般のSFA実験では、Agスパッタリングされた上下の雲母シート表面を、Ag層表面を外側に向けて雲母表面間にある液体に対して実験する。本実験では組み合わせられたDNAプローブフィルムを使用するために、一方はAg層、他方は雲母表面が相互に対向するように配置した。

【0029】Ag層表面と雲母表面との間隔が300Åになると、強いファンデルワールス力によりフラット接触でジャンプしたが、これは雲母及びAg層の表面が非常に清潔であることを意味する。Ag層と雲母の接触点の複数箇所を測定すると、構造的妨害の波長は2~4Å内外で一定した。Ag層表面の粗さは、15~20Årms内外と推定されたが、両面の相対的な間隔は比較的正確に測れた。厚さ算出時に必要なDNA溶液の屈折率は1.46と仮定した(Jordan, C. E.; Frutos, A. G.; Thiel, A. T.; Corn, R. M. Anal. Chem. 1997, 69, 4939参照)。

【0030】プローブには、ハンターシンドローム病の原因と考えられる、Iduronate-2-sulphate (IDS) エキソン遺伝子の一部の下記配列番号1のオリゴヌクレオチドを用いた。

【0031】配列番号: 1

(SH-C6-5'-GTT CTT CTC ATC ATC-3')

【0032】該オリゴマーをResearch Genetics (Huntsville, AL) で購買し、5'末端をアルカンチオールスパーサにて変形させた。分子量は $M=4651\text{g/mol}$ であった。チオール変性したss-DNA 1mM溶液(1MN NaH_2PO_4 , pH4.0)にAg層表面を接触させ、3時間吸着させた後、バッファ溶液及び脱イオン水で順次洗浄して N_2 ガスで乾燥した。物理的に吸着したDNAを除去し、ss-DNAプローブのを表面から延びた構造にするために1mMメルカプトヘキサノール、($\text{HS-(CH}_2)_6\text{OH}$)に10分間接触させ、次いで脱イオン水で洗浄し N_2 ガスで乾燥した。

【0033】[実施例2]

プローブと相補的な序列の混成化

混成化反応実験を行うために、プローブに相補的な下記配列番号2 (3'-CAA GAA GAG TAG TAG-5')を有する1.5mM ss-DNA溶液(TE-1M NaCl buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1M NaCl pH7.6)と38℃で2時間反応させ、次いで、38℃ TE-1M NaClバッファと脱イオン水で順次に洗浄して N_2 ガスで乾燥させた。

【0034】配列番号: 2

(3'-CAA GAA GAG TAG TAG-5')

【0035】[実施例3]

反発力の測定

反発力の測定は、図1に示したセンサーの原理を使用した改変された表面力装置(Modified Surface Forces Apparatus, S. Granick, Science, 253, 1374, 1991, J. Peachey, J. VanAlsten, and S. Granick, Rev. Sci. Inst, 62, 463, 1991参照)を使用して測定した。Ag層表面にチオール変性したオリゴマーを吸着させた後、混成化反応前後のDNA薄膜の反発力を測定した。

【0036】ss-DNAプローブの固定または混成化反応後の表面間にNaCl 1M溶液を1滴落として実験を行った。この際、下面は純粋雲母となり、上面はAg層表面チオール変性されたDNAを固定させた面となるか、あるいはこの面にターゲットで混成化された表面となった。

【0037】対照実験において、DNAは水中で負電荷を帯びる非処理の雲母には吸着しなかった。したがって、チオール変性されたDNAオリゴマーは、オリゴマーの末端部分が付着し末端拘束された(end-tethered)形状を有し、反対側の雲母表面には非特異的な吸着は少ない。

【0038】両面間の間隔が1mm以上離れている時、マイクロピペットを用いてNaCl 1M 溶液を1滴落とし、下の雲母表面が固定されているスプリングに一定の力を加えて両面の間隔を徐々に狭めつつ、両面の間隔を、多重ビーム干渉測定方法を用いて測定した。与えられた力とストリング定数によって移動する距離と実際移動した距離とを比較して、図5の上図のような力距離曲線を求めた。

【0039】図5は、図1に示したセンサーの原理を使用した改変された表面力装置(S. Granick, Science, 253, 1374, 1991, J. Peachey, J. VanAlsten, and S. Granick, Rev. Sci. Inst, 62, 463, 1991参照)を用いて測定したデータを示すグラフである。ここで、Ag層表面にチオール変性したローブを組み合わせ単層方法で吸着させて相補的な塩基対と混成化反応前後のDNA薄膜の反発力(上図)及びせん断応力(下図)を求めた。四角形(■): 1.0M NaCl溶液中のss-DNA; 三角形(Δ): 過量のメルカプトヘキサノール添加後の1.0M NaCl溶液中のss-DNA; 円形(●): 混成化反応後の1.0M NaCl溶液中のds-DNA。上図には曲率半径Rで標準化した反発力(F/R)をY軸、両面間の間隔をX軸で示し、下図にはせん断応力、すなわち弾性せん断

係数 G' を左側 Y 軸とし、有効接触面積で標準化していない弾性せん断力定数 g' を右側 Y 軸とし、両面間の間隔を X 軸とし、半対数スケールで示した。図 5 にはせん断応力 G' : 垂直圧力 P_N の比率を示した。なお、せん断応力は 1.3 Hz で測定し、有効接触面積はラングバイン近似式 ($A_{eff} \sim 2\pi RD$) を用いて計算した。

【0040】参考に、実験に使用した $ss-DNA$ 15mer の長さは 77 Å、 $ds-DNA$ の長さは 63 Å と予測される。図 5 の上図に四角形記号で示したように、メルカプトヘキサノールで処理する前のチオール末端を有する $ss-DNA$ プローブが 1.0M NaCl 溶液中に含まれる場合、反発力は約 4.3 ± 2 Å から始まり、 2.6 ± 2 Å ではそれ以上圧縮されない硬壁厚さが測定できた。

【0041】 ss -プローブを吸着させた表面に、メルカプトヘキサノールで処理した場合 (三角形) には、DNA プローブがより延びた構造となり、反発力が始まる膜厚が $ss-DNA$ プローブのみ存在する場合よりも厚い約 8.0 ± 2 Å から始まってそれ以上圧縮されない硬壁厚さは、 2.8 ± 2 Å であった。

【0042】混成化反応以後には反発力が約 7.2 ± 2 Å から始まって 4.1 ± 2 Å までは単調に増加し、 4.1 ± 2 Å で突然 3.0 ± 2 Å にジャンプした。これは比較的硬い $ds-DNA$ が過重な垂直圧力に耐えられず、チルト角を変えたものと考えられる。したがって、 $ds-DNA$ の大きさは 4.1 ± 2 Å ないし 3.0 ± 2 Å、望ましくは約 3.1 ± 2 Å である。

【0043】以上の結果から分かるように、DNA プローブが固定された表面に他の表面を近づけつつ反発力を測定すれば、その力の差だけでも混成化反応の発生有無が分かる。すなわち、反発力だけを正確に測定しても単一及び二重筋の厚さや力の差が確認できる。しかし、反発力は正確に測定しにくく、単一と二重筋との差がせん断応力に比べて小さいという短所がある。

【0044】[実施例 4]

せん断応力の測定

次に、せん断応力を用いて DNA 混成化反応を検出する例を説明する。図 1 の模式図に示すせん断応力測定装置を用いて、DNA のせん断応力の変化を測定して DNA の混成化反応の有無を検出する。実験時、せん断振幅は 2 Å より小さくして、できるだけシステムを妨害しない線形様式で実験した。

【0045】信号入力部として機能する振動板 3 を種々の周波数でサイン曲線型励起を行い、信号出力部として機能する反対側の振動板 3' の運動を検出し、弾性及び粘性応答を区別して試料の弾性力または粘性力を測定し、その中の弾性力を図 5 の下図に示した。混成化反応後の弾性力が粘性力より顕著に大きいことが分かる。これは混成化された DNA の強度が $ss-DNA$ よりはるかに大きいためと考えられる。

【0046】また、図 5 の挿入図から分かるように、せん断応力を G' として垂直圧力 P_N で標準化を行えば、せん断応力のはるかに大きいことが分かる。したがって、反発力よりせん断応力は混成化反応検出において感度が高いことが分かる。

【0047】図 5 の実験は、せん断振幅とせん断周波数とを一定にしてギャップ厚さを薄くしつつ実験した結果であって、図 6 は両面間の間隔を図 5 の実験結果から得た二分子大きさレベルの 3.1 ± 2 Å に固定させておき、 $ss-DNA$ 、 $ds-DNA$ フィルムに種々の周波数のせん断を与え、弾性せん断係数 (上図) と粘性せん断係数 (下図) を比較したデータである。ここで、データ記号は図 5 と同一である。左側 Y 軸の有効弾性せん断係数 G' (上図) と有効粘性せん断係数 G'' (下図) とはラングバイン近似式を使用して標準化した力であり、右側 Y 軸は有効接触面積で標準化していない弾性 (上図) 及び粘性 (下図) せん断力定数 g' 、 g'' であり、X 軸はラジアンせん断周波数である。図示したように混成化反応以後の試料の弾性及び粘性係数が混成化反応前の $ss-DNA$ よりオーダーが大きいことが分かり、これを用いて DNA の混成化反応の有無を検出できる。

【0048】図 7 は、センサー基板 4 と試料基板 6 との間隔が 3.1 ± 2 Å である時、 $ss-DNA$ 、 $ds-DNA$ フィルムのせん断振幅を広めた際、測定した弾性せん断係数 (黒抜き記号) と粘性せん断係数 (白抜き記号) を示すグラフである。データ記号は四角形 (■, □) : 1.0M NaCl 溶液中の $ss-DNA$; 三角形 (▲, △) : 過量のメルカプトヘキサノール添加後の 1.0M NaCl 溶液中の $ss-DNA$; 円形 (●, ○) : 混成化反応後の 1.0M NaCl 溶液中の $ds-DNA$ であり、標準化方法は図 6 と同一である。せん断振幅を広めると、ある限界せん断振幅で係数が減少する。しかし、せん断振幅が 10 nm 程度となって試料が非線形条件にあっても $ss-DNA$ プローブと混成化反応以後のせん断係数の差は 10 倍以上であった。

【0049】以上では配列が完全一致したターゲット試料を使用して実験したが、単一塩基突然変異などの突然変異性のある試料を使用しても ss -プローブと大差ないと予想される。

【0050】

【発明の効果】前述したように、本発明の検出方法によれば DNA またはプロテインなどの生物質を分析する時、センサー表面のプローブがターゲットと結合する前後のセンサー表面のせん断応力差を測定することによって、既存の蛍光物質を用いた検出方法と違って別途のラベル付けが不要で、電気的信号にて検出でき、かつカンチレバーの屈折程度を測定する方法に比べてさらに敏感でレーザーのような高価の装備が不要になる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】圧電タイプの振動板を用いてせん断応力を測定

11

するせん断応力測定センサーの模式図である。

【図2】Aは、本発明に係るせん断応力測定センサーに相異なるプローブを付着する方法を、Bは、分析しようとする試料との混成化反応を示す模式図である。

【図3】図1のセンサーを複数配列したことを示す模式図である。

【図4】静電タイプの振動板を用いてせん断応力を測定するセンサーの模式図である。

【図5】せん断力測定ができるように改変した表面力装置を使用してDNAの混成化反応前後のDNA薄膜フィルムの反発力（上図）及びせん断応力（下図）を測定したデータを示すグラフである。

【図6】センサー基板と試料基板との間隔が $31 \pm 2 \text{ \AA}$ である時、ss-DNA、ds-DNAフィルムの種々の周波数で測定した弾性せん断係数（上図）と粘性せん断係数（下図）とを示すグラフである。

【図7】センサー基板と試料基板との間隔が $31 \pm 2 \text{ \AA}$ である時、ss-DNA、ds-DNAフィルムのせん

12

断振幅を広めた際、測定した弾性せん断係数（黒抜き記号）と粘性せん断係数（白抜き記号）とを示すグラフである。

【符号の説明】

- 1…せん断応力測定センサー
- 2…支持基板
- 3, 3'…振動板
- 4…センサー基板
- 5…信号検出部
- 6…試料基板
- 7…電気容量測定装置
- 8…相異なる種類のプローブ
- 9…プローブを入れたマルチウェル容器,
- 10…ターゲットを入れた単一ウェル容器
- 11…せん断応力測定センサー
- 13, 13'…振動板
- 14…センサー基板

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Samsung Electronics Co., Ltd.

<120> Method and sensor for detecting the binding of biomolecules by shear stress measurement

<130> 2002P0633

<140>

<141>

<150> KR2001-065484

<151> 2001-10-23

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 1

gttcttctca tcac

15

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

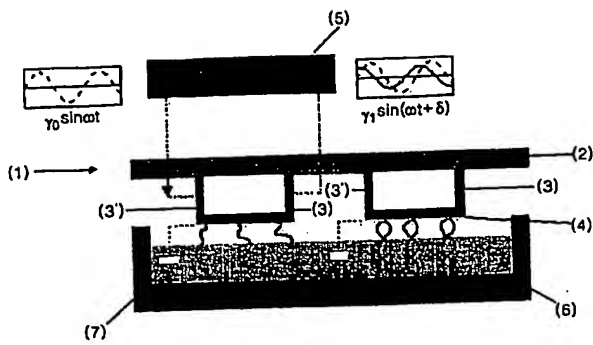
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 2

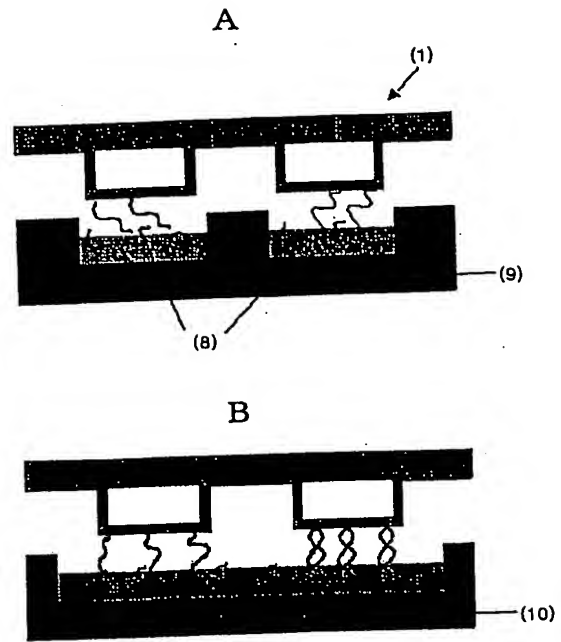
caagaagagt agtag

15

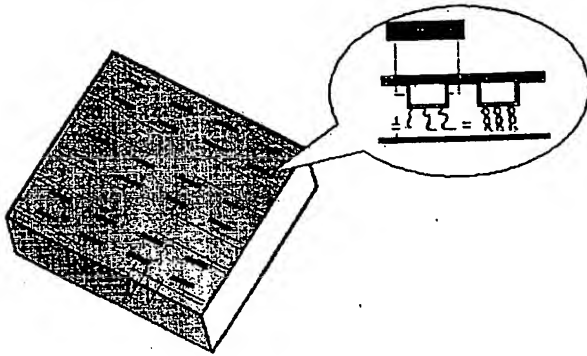
【図1】



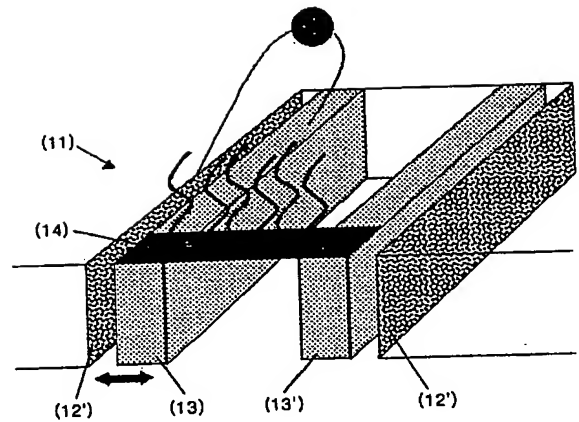
【図2】



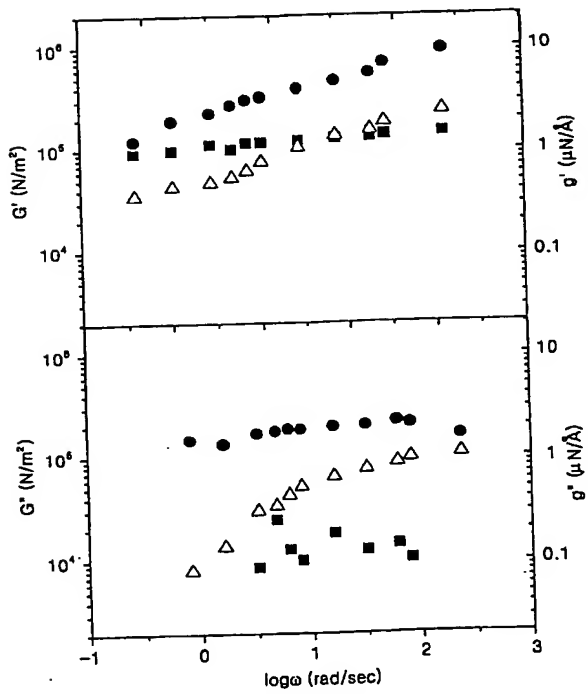
【図3】



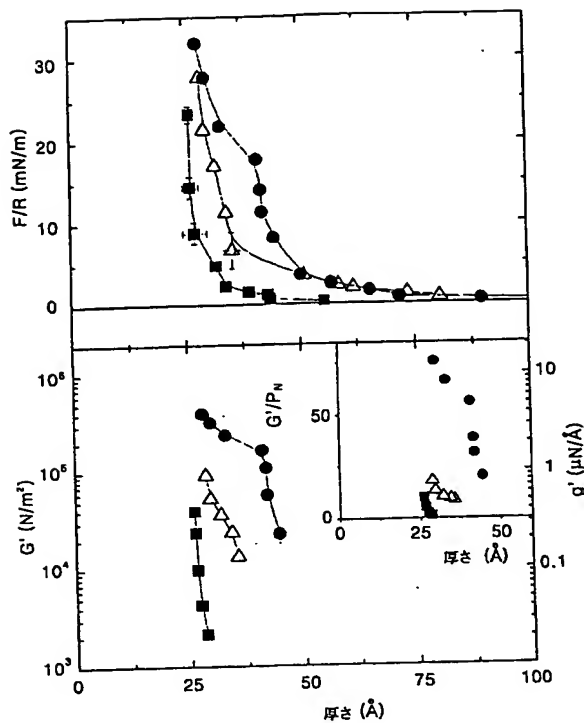
【図4】



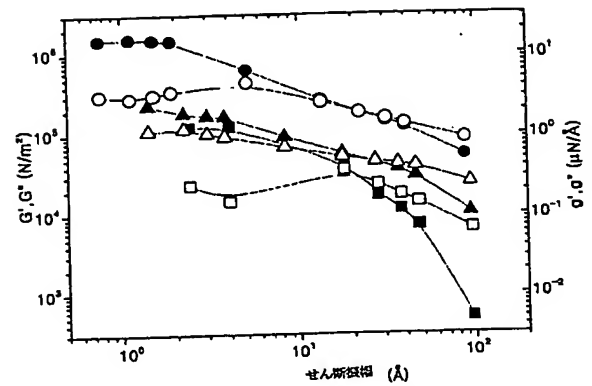
【図6】



【図5】



【図7】



フロントページの続き

(72) 発明者 ▲ご▼ 光 ▲いく▼
大韓民国京畿道城南市盆唐区金谷洞177番
地 チョンソルマウル嶺南アパート106棟
902号

(72) 発明者 林 根 培
大韓民国京畿道水原市八達区靈通洞1053-
2 番地 鳳谷マウル豊林アパート232棟
1205号
(72) 発明者 尹 大 成
大韓民国京畿道城南市盆唐区亭子洞247-
2 番地101号

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.